

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representation of
The original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

(54) CARCINOSTATIC AGENT

(11) 62-135429 (A) (43) 18.6.1987 (19) JP
 (21) Appl. No. 60-277390 (22) 10.12.1985
 (71) RYOJI SAKAI (72) RYOJI SAKAI
 (51) Int. Cl.⁸ A61K35/78

PURPOSE: A carcinostatic agent having low side effects, comprising aloe as an active ingredient.

CONSTITUTION: A carcinostatic agent for oral administration containing an extract of aloe (Aloe saponaria or Aloe arborescens) as a constituent components. An extract of a component from which a harmful factor is removed is administered by rectal, sublingual, inhalation and partial application besides injection preparation. This drug contains aloe which has high anti-cancer action and is effective against stomach cancer among plants which have been eaten and drunk. Stomach cancer and colon cancer mainly have glandular carcinoma and squamous cell carcinoma and this carcinostatic agent is effective against glandular carcinoma and squamous cell carcinoma of lung and has low side effects. Nowadays, a solid cancer mainly depends upon surgical ablation, but it is not said that its result is absolutely effective. Consequently, use of this drug with surgical therapy is much expected to improve treatment of patient.

(54) CARCINOSTATIC AGENT

(11) 62-135430 (A) (43) 18.6.1987 (19) JP
 (21) Appl. No. 60-277391 (22) 10.12.1985
 (71) RYOJI SAKAI (72) RYOJI SAKAI
 (51) Int. Cl.⁸ A61K35/78

PURPOSE: A carcinostatic agent containing HIRAMILEMON (a kind of lemon produced in Okinawa Prefecture) as an active ingredient and low side effect.

CONSTITUTION: A carcinostatic agent for oral administration, containing an extract of HIRAMILEMON as a constituent component. An extract of a component from which a harmful factor is removed is administered by rectal, sublingual, inhalation and partial application besides injection preparation. In this drug, an anti-cancer component of the drug indirectly or directly acts on malignant tumor cell and is effective against stomach cancer. Since stomach cancer is squamous cell carcinoma or glandular carcinoma and this carcinostatic agent is expected to be effective against squamous cell carcinoma and glandular carcinoma of lung. Nowadays, a solid cancer mainly depends upon surgical ablation, but its result is not absolutely effective. Consequently, use of this drug with surgical therapy is much expected to improve treatment of patient.

(54) BONE MARPHOZENIC AGENT

(11) 62-135431 (A) (43) 18.6.1987 (19) JP
 (21) Appl. No. 60-274318 (22) 7.12.1985
 (71) KATSUYUKI FUJII(1) (72) KATSUYUKI FUJII(2)
 (51) Int. Cl.⁸ A61K37/02, A61K35/12, A61K35/32, A61K37/12

PURPOSE: A bone marphozenic agent which consists of Bone Marphozenic Protein (BMP for short) and collagen, is useful for promoting new formation of bone, wherein a carrier is decomposed and absorbed in organism.

CONSTITUTION: A bone marphozenic agent containing BMP and collagen. BMP has about 18,000 mol.wt. and bone introducing action but BMP alone immediately diffuses and disappears at the affected part by humors. When BMP is supported on a collagen (e.g., atherocollagens), retention time of BMP can be controlled and yet a carrier can be decomposed and absorbed in organism. BMP and the collagen may be in a mixed state or bond state, sponge, sheet, microbead or gel state is considered as shape of the carrier and various applications are possible depending upon state of deficient part of bone. BMP separated and purified from osteosarcoma or bone tissue is usable as the BMP.

⑫ 公開特許公報(A)

昭62-135431

⑬ Int.Cl.⁴A 61 K 37/02
35/12
35/32
37/12

識別記号

庁内整理番号

7138-4C
7138-4C
7138-4C
7138-4C

⑭ 公開 昭和62年(1987)6月18日

審査請求 未請求 発明の数 1 (全4頁)

⑮ 発明の名称 骨形成剤

⑯ 特 願 昭60-274318

⑰ 出 願 昭60(1985)12月7日

⑱ 発 明 者	藤 井	克 之	東京都世田谷区砧6-24-12
⑱ 発 明 者	宮 田	暉 夫	東京都新宿区下落合3-6-29
⑱ 発 明 者	古 瀬	正 康	相模原市南台3-8-9
⑲ 出 願 人	藤 井	克 之	東京都世田谷区砧6-24-12
⑲ 出 願 人	株 式 会 社	高 研	東京都新宿区下落合3-5-18
⑳ 代 理 人	弁 理 士	田 中 宏	

明 細 書

1 発明の名称

骨形成剤

2 特許請求の範囲

1. 骨形成蛋白質とコラーゲンとよりなることを特徴とする骨形成剤
2. 骨形成蛋白質がコラーゲンに物理的に結合されている特許請求の範囲第1項記載の骨形成剤
3. 骨形成蛋白質がコラーゲンに化学的に結合されている特許請求の範囲第1項記載の骨形成剤
4. 骨形成剤がスポンジ状、シート状、マイクロビーズ状又はゲル状である特許請求の範囲第1項記載の骨形成剤
5. コラーゲンがアテロコラーゲン、ファイバーコラーゲン及び酸可溶性コラーゲンである特許請求の範囲第1項記載の骨形成剤

3 発明の詳細な説明

(産業上の利用分野)

本発明は骨の形成を促進させるための骨形成剤に関し、特にその薬効を持続させることができる骨形成剤に関する。

(従来の技術)

骨形成蛋白質(Bone Morphogenetic Protein以下単にBMPという。)は分子量が約18,000であつて骨誘導作用を呈することは認められており、その為生体の骨欠損部や骨折部にBMPを導入して生体に骨誘導現象を発現させようといふところから来た。しかし、BMPをその患部にそのまま移植すると、体液により直ちに拡散消失してしまふため所期の目的を達成するには困難であり、したがつてBMPを有効に作用させる為にはBMPを患部に数日間以上とどめておく必要がある。しかして患部に薬剤を供給し薬効を持続させる方法の一つとして医薬除放剤の使用がある。すなわち、例えば薬効成分をポリマーなどの担体に包含させた医薬除放剤をつくり、これを生体内の患部又はその付近に埋め込み薬効成分を徐々に放出させて薬効を持続させる方法である。この場合担体とし

ては毒性が無く、生体との適合性を有し更に生体に分解吸収されるものであることが必要である。そして医療除放剤の担体としてコラーゲンの使用が検討されて来た。(例えば特願昭55-25806号、特願昭58-23994号等参照)コラーゲンは動物の結合組織の主要蛋白質で他の蛋白質より抗原性が少なく細胞培養基質や医療用具として手術用糸創傷カバー材などに用いられ安全性も高いことが知られている。殊にコラーゲンにペプシンを作用させることによりコラーゲンの抗原性に関与する分子末端にあるテロペプチドを除去したコラーゲン(アテロコラーゲンと称される)を使用することにより一層安全性が高く、望ましい。更にテロペプチドは架橋部位でもあるのでペプシンで処理することによりコラーゲンを分子状に分散させることができ、したがって、これを用いることにより担体の形状としてはシート状、スポンジ状、ゲル、マイクロビーズ^ス等いろいろの形に成形加工することができる。しかし、未だBMPをコラーゲンに担持させることは行なわれていない。他方、

結合状態の何れでもよく、また、結合状態としてはBMPをコラーゲンに包含もしくは吸収させた物理的結合或は荷電的結合や架橋剤による結合等化学的結合の何れでもよい。また、化学修飾により電荷の状態を変化させたコラーゲンをを用いたり、或はコラーゲンの密度や架橋状態などを変化させることによつてBMPの保留時間を調節することができる。更にコラーゲンの使用形態によつて種々の適応例があるが、その二、三を列挙すると次の通りである。

- (1) 骨の欠損部分に骨を誘導する時はBMPをコラーゲンスポンジに含浸したものを欠損部分に移植する。
- (2) 長幹骨の骨折部分の補強を目的とする場合にはBMPを含有するコラーゲン膜で骨折部分をつむ。
- (3) 体表に近い部分の骨折(例えば頰骨、股骨など)の骨癒合促進を目的とする場合には低温で溶液状で体温でゲル化するようなコラーゲン溶液(特願昭58-137007号参照)に

生体親和性の高いセラミック材よりなる合成ハイドロオキシアパタイト(HAPと略称する)の多孔質内に家兎長管皮質より抽出したBMPを折出結合させた骨形成因子結合ハイドロオキシアパタイト(BMP-HAP)が新生骨形成能を有することが知られているが、この場合合成HAP自体は生体内において補強材的な意味があり、BMPによつて骨を誘導してまわりの骨と接合しようとするものであつて最終的にHAP^骨異物として体内に残る問題があつた。

(解決しようとする問題点)

本発明者らは、担体は生体内で分解、吸収されるような骨形成剤につき種々検討した結果、本発明を完成するに至つたもので、本発明の目的は骨の新生形成を促進するようにBMPの薬効を持続させると共にBMPを担持している担体は生体内で分解吸収される骨形成剤を提供するものである。

(問題点を解決するための手段)

本発明は骨形成蛋白質とコラーゲンとからなる骨形成剤であつて、この場合両者は混合状態或は

BMPを混和し経皮的に同部位に注入する。

本発明で使用するコラーゲンとしては前記したテロペプチドを除いたアテロコラーゲン、可溶性コラーゲン又はファイバーコラーゲン等何れの種類のものでもよいが特にアテロコラーゲンが好ましく、BMPとしては骨肉腫や骨組織より分離精製したもの等が使用できる。

以下、実施例をもつて本発明を説明する。

実施例1

ハムスター骨肉腫O₅15の骨肉腫組織を細切し冷脱イオン水中でホモジエナイズ後遠心操作(2000~3000G、15分)にて沈澱を回収する。冷アセトンおよび冷メチルエーテル処理により脱脂、乾燥後、約100倍容の4M塩酸グアニジン溶液、pH5.0にて248時間、室温にて攪拌抽出を加える。遠心(10,000G、30分)にて得られた上清に3倍容の冷エタノール(5%酢酸を含む)を少しずつ加え、4℃にて12時間放置する。遠心にて糸状の析出物を除去した後、大量の10mMリン酸ナトリウム緩衝液に対し23日間の透析

を行う。析出物を遠心(10,000 G、15分)にて回収し、4 M塩酸グアニジン溶液にて溶解し、Sephacryl-S-200(4×150cm)にするクロマトグラフィーを行う(図1)。Fraction bを回収し、10 mMリン酸ナトリウム緩衝液に対して透析して得られた析出物を4 M塩酸グアニジンで溶解後、Sephacryl-S-200(1.5×150cm)にて再クロマトグラフィーを行う(図2)。Fraction bが骨形成蛋白である(分子量およそ175,000)。仔牛真皮から無菌的かつパイロジェンフリーで精製したアテロコラーゲンの1%液(pH 7.0)を凍結乾燥しスポンジ状としこれを0.1%ヘキサメチレンジイソシアネート、エタノール溶液に1時間浸漬後充分洗滌した。これに同容のBMP懸濁液0.1 mg/mlを吸収させ、凍結乾燥を行なった。ラットに骨欠損部を作り該部位にこのスポンジを埋植する。BMPをそのまま投与した対照部が7週間で治癒したのに対し実験部では3週間で治癒し良好な結果が得られた。

実施例 2

実施例 3

実施例1で用いたアテロコラーゲンを5℃で0.02 M Na_2HPO_4 、0.15 M Na_2O のバッファーに無菌で2%に溶解する(この条件のコラーゲンは10℃以上で繊維形成をしてゲル化する。)これに、実施例2で精製し得られたBMPを0.1 mg/mlとなるように混合した。

頰骨を骨折した家兎の骨折部にこのBMPを含んだコラーゲン溶液を注射器で注入した。その結果、普通治癒に8~12週を要するところ約3.5週で完治した。

実施例 4

実施例3で用いたBMP分散アテロコラーゲン溶液を5℃のトルエンに良く攪拌しながら分散させ、その状態で37℃に加熱しマイクロビーズを得た。これをエタノールで洗浄後PBSに置換し、滅菌を行なった。このビーズを注射器でマウスの骨欠損部に注入した結果す速い骨の誘導が認められた。

(効果)

ヒト、牛、ウサギなどの骨組織を液体窒素中で粉碎して、骨粉末を得る。これに0.6 N塩酸を加え、2℃、24時間攪拌することにより脱灰を行う。遠心にて回収した脱灰骨を水洗後、冷アセトンおよび冷メチルエーテル処理を行い脱脂、乾燥する。次いで、4 M塩酸グアニジン溶液、pH5.0による骨形成蛋白の抽出、Sephacryl-S-200による精製へと進めるが、その方法は、以下実施例1と同様に行ないBMPを得た。

このBMPを0.1 mg/mlとなるように実施例1で用いたアテロコラーゲンの1%溶液(pH 3.0)に混合する。これを脱泡後1cmの深さの型に入れ、風乾し、0.02 M Na_2HPO_4 に浸漬し中和する。水洗後さらに風乾し、型からはずし厚さ約100μmのシートが得られた。

ラットの脛骨に骨折を作りその部分にこのシートをまき、治癒の経過を観察した。結果このシートを用いたラットは3週、BMPのみを用いたラットは6週、BMPを用いなかつたラットは6週で治癒し、このシートの有効性が認められた。

本発明はBMPを生体適合性の良好なコラーゲンに担持させたことによりその薬効を持続することができ、したがって各実施例に示されているようにBMPを直接投与する場合に比して短時間で治癒することができると共にコラーゲンに担持させる手段を変更することによつてBMPの保留時間を調節でき、しかも治癒後はコラーゲンは体内で分解吸収される等の顕著な効果を奏するものである。

4. 図面の簡単な説明

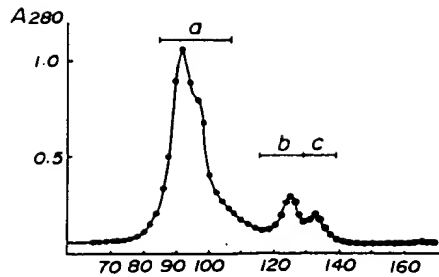
第1図はセファクリル-S-200ゲルの分面を示した図、第2図は第1図フラクションbをセファクリル-S-200ゲルで再度分面した図。

出願人 藤井 克之 ほか1名

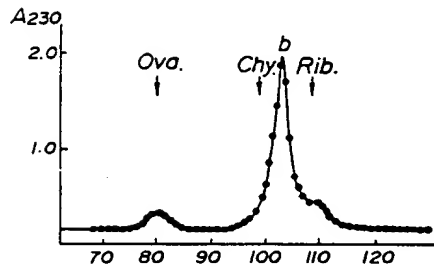
代理人 田中 宏

昭和61年2月27日

第1図



第2図



特許庁長官 宇賀道郎 殿

1. 事件の表示

昭和60年特許願第274318号

2. 発明の名称

骨形成材

3. 特許出願人

住所 東京都世田谷区砧6-24-12

氏名 藤井 克之 (ほか1名)

4. 代理人

住所 東京都港区虎ノ門二丁目5番5号

ニュー虎ノ門ビル5階(電話03-501-1830)

氏名 8940 弁理士 田中 宏

5. 補正命令の日付 自 発

6. 補正により増加する発明の数 なし

7. 補正の対象

明細書、発明の詳細な説明の欄

8. 補正の内容

(1) 明細書第6頁第15行目「pH5.0に

248時間」を「pH5.0にて48時間」と補正する。

(2) 同第6頁第20行目「対し23日」を「対して3日」と補正する。

(3) 同第7頁第9行目「分子量およそ175,000」を「分子量およそ17,500」と補正する。

(4) 同第8頁第16行目「ラットの骨」を「ラットの肋骨」と補正する。

(以上)